【使用上または取り扱い上の注意事項】

1） 使用上の注意事項

① 本キットをご使用になる際には、取扱説明書をよく読み、記載された試験方法に従って使用してください。
② 本キットは研究用試薬であり、臨床的診断を下す目的で使用することはできません。
③ 各試薬は保存温度を厳守してください。また保存にあたっては、コンタミネーション防止に注意してください。
④ 本キットは溶血素リステリオリシン O をコードする *hly* 遺伝子を検出対象としているため、致死的病原性を持たないリステリア・モノサイトゲネスは偽陰性となる可能性があります。
⑤ 本キットにより得られた結果の判断および利用は、お客様の責任のもと実施してください。また、その結果生じた損害および損失については、当社は責任を負うことはできません。
⑥ 試料溶液の調製に使用する器具ならびに試薬類（培地を含む）の使用方法等については、それぞれの製造元もしくは販売元にご確認ください。
⑦ 本取扱説明書は検査担当者のガイドラインとして作成されています。各操作手順や各々の食品におけるアプリケーションの妥当性については自ら検証してください。
⑧ 商品の仕様については、予告なく変更になる場合があります。

2） 危険防止上の注意事項

① 本キットの検出対象であるリステリア・モノサイトゲネス、またはそれ以外の微生物による感染の可能性もあるため、試験を実施する際には保護手袋、保護メガネ等を着用するなど十分留意してください。
② 試験実施の際には、適切な設備・施設、責任ある管理者の指導のもとで標準的な微生物検査手順にて実施してください。
③ 誤って試料溶液等が目や口に入った場合には、水道水で洗い流す等の応急処置を行い、医師の手当てを受けてください。

3） 廃棄上の注意事項

① 増菌後の培養液、試料および DNA 抽出液の残りなどは、感染の可能性があると考え、必ずオートクレーブ処理（121℃、20分）などの適切な滅菌処理を施してください。
② 本キットならびに試料および試料溶液の残りなどを廃棄する場合には、当該地域の廃棄物に関する規定に従い、衛生面、環境面に十分配慮し廃棄してください。

【貯法・使用期限】

1） 貯法： 増幅試薬： 冷凍（-20℃）、解凍後は冷蔵（2～8℃）にて保存してください。
テストストリップ： 冷蔵（2～8℃）、遮光にて保存してください。また、凍結は避けてください。

2） 使用期限： 製造日より 6 ヶ月（使用期限は外装に表示）

注1： 増幅試薬の使用期限は冷凍保存時のものです。解凍後の使用期限は設定しておりませんので、お客様の責任のもとご使用ください。

【包装単位】

製品名	構成品	容量
GeneLine リステリア・モノサイトゲネス 増幅試薬	A:PCR マスターミックス	0.5mL×2 本
	D:取扱説明書	1 部
GeneLine リステリア・モノサイトゲネス テストストリップ	B:テストストリップ	4 テスト×12 包装
	C:展開用バッファー	1.4mL×2 本
	D:取扱説明書	1 部
	E:ビニールパウチ袋	1 枚

【参考文献】

1） 光山正雄:リステリア属菌, 細菌学, 朝倉書店, 454-460 (2002).
2） Paul S. Mead, et al. : Emerging Infectious Diseases, Vol.5, No.5, 607-625 (1999).
3） 厚生労働省監修:食品衛生検査指針微生物編, (社)日本食品衛生協会, 249-265 (2004).
4） 五十君靜信:食品衛生研究, 53, 19-23 (2003).
5） 厚生省生活衛生局乳肉衛生課長通知:平成 5 年 8 月 2 日衛乳第 169 号(1993)

〔販売元および問い合わせ先〕
キット外装ラベルに記載

〔製造元〕
〒300-2646 茨城県つくば市緑ヶ原 3-3
日本ハム株式会社 中央研究所
電話:029(847)7825／FAX:029(848)1256
URL:http://www.rdc.nipponham.co.jp

2012 年 10 月作成（第 4 版）

[研究用試薬]

GeneLine リステリア・モノサイトゲネス 増幅試薬／テストストリップ ≪取扱説明書≫

※本キットをご使用になる前に必ずお読みください。

【開発の経緯】

リステリア属菌は、土壌や河川、野菜など自然界に広く存在し、低温増殖能や 10%食塩耐性を有するため、冷蔵食品や塩漬け食品においても増殖します [1]。リステリア属菌の中でもリステリア・モノサイトゲネスは、ヒトに感染しリステリア症を起こすため、その他の菌種との鑑別が特に重要となります。海外では、牛乳、チーズ、野菜、食肉などの食品を原因とした集団発生事例があり、特に米国では、毎年約 2500 人が感染し、そのうち約 500 人が死亡していると推定されています [2]。日本国内では、本菌による食中毒事例はほとんど報告されていませんが、食品の汚染率は日本と欧米にほとんど差が認められないことから [3), 4)]、今後本菌による食中毒事例が発生する可能性は否定できないと言われています。

本品は、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法と簡易・迅速な核酸検出法である核酸クロマトグラフィーを組み合わせた、リステリア・モノサイトゲネスを検出するための研究用試薬です。

【本品の特徴】

1） 1 本のチューブで PCR から結果判定までの操作ができます。
2） 培養後の増菌液から約 2 時間で結果が得られます。
3） アガロース電気泳動の必要がなく、DNA 抽出操作以降で必要な機器はサーマルサイクラーのみです。

【キットの内容】

1） 構成品

増幅試薬（冷凍試薬）
A: PCR マスターミックス…… 0.5mL×2 本
D: 取扱説明書…… 1 部
テストストリップ（冷蔵試薬）
B: テストストリップ…… 4 テスト×12 包装
C: 展開用バッファー…… 1.4mL×2 本
D: 取扱説明書…… 1 部
E: ビニールパウチ袋 …… 1 枚

2） 成分（テストストリップ）

① 試薬含有部
ラテックス標識リステリア・モノサイトゲネス検出プローブ
ラテックス標識 16S 検出プローブ
② 展開部
リステリア・モノサイトゲネス検出プローブ
16S 検出プローブ

注:「16S」は細菌に共通して保持されている遺伝子配列です。

注： 増幅試薬とテストストリップは別売りです。また、DNA 抽出試薬は別途ご準備ください。

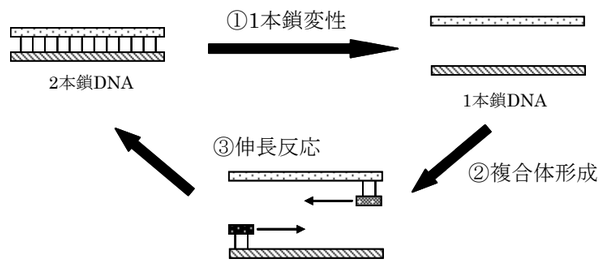
【目的】

1） 食品中に含まれるリステリア・モノサイトゲネスの検出。

【検出原理】

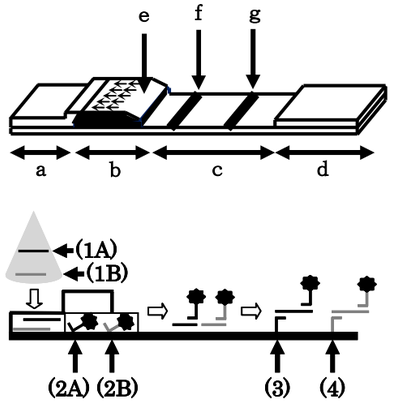
1） PCR 法

PCR 法は、DNA 合成酵素（DNA ポリメラーゼ）およびプライマーを用いて増幅対象の DNA を増幅する手法です。①高温で 2 本鎖 DNA を 1 本鎖に変性させ（1 本鎖変性）、②プライマーを増幅対象 DNA の一部に結合させ（複合体形成）、③DNA ポリメラーゼがプライマーを起点として相補的な DNA を伸長させる（伸張反応）、という 3 つのサイクルを繰り返すことによって、増幅対象の DNA を指数関数的に増幅します。



2) 核酸クロマトグラフィー

テストストリップの試料滴下部(a)に展開用バッファーと混合した PCR 反応液(試料溶液)を含浸させると、試薬含有部(b)に含まれるラテックス標識プローブ(2A)が溶解し、溶液中のリステリア・モノサイトゲネス由来増幅 DNA(1A)と複合体を形成します。形成された複合体は展開部(c)を毛細管現象により移動し、テストライン出現位置(f)に固定化されたリステリア・モノサイトゲネス検出プローブ(3)に捕捉され、ラテックスによる青黒色のラインが出現します。本キットはこの青黒色のラインを目視により確認し、試料溶液中のリステリア・モノサイトゲネスの有無を判定します。また、細菌に共通する DNA(16S)の増幅産物(1B)がラテックス標識プローブ(2B)と複合体を形成して展開部(c)を移動し、16S 検出プローブ(4)に捕捉され、16S 検出ライン出現位置(g)に青黒色のラインを形成します。このラインの有無により、PCR と核酸クロマトグラフィーが正常に実施されたことを確認します。



【鋳型 DNA の調製】

1) 必要な機器・器材

ストマッカー袋(フィルター付を推奨)、ストマッカー、インキュベーター、オートクレーブ、増菌用培地、DNA 抽出試薬、サーマルサイクラー、PCR 用 0.2mL チューブ、他

2) 試料の調製

① 被検食品から 200g(または 200mL)以上を採取してください。

② 固体の場合には、できるだけ多くの部位から少しずつ採取した 25g、液体の場合にはよく混合した 25mL を試料としてください。拭き取り検査では、拭き取り材料のガーゼ等をそのまま試料とするか、少量の希釈水等で振り出した液を試料としてください。

3) 増菌培養

① 試料 25g(または 25mL)に対し 9 倍量(225mL)の培地を加え、試料によって適切な時間ストマッキングした後、所定の温度にて所定の時間、培養してください。

注1: 公定検査法[3), 5)]、FDA 法、USDA-FSIS 法に従い、各々に記載されている培地、培養時間で培養してください。

4) DNA 抽出操作

① 培養終了後、ストマッカー袋をインキュベーターより取り出し、培養液の飛散に注意しながら、緩やかに攪拌してください。

② 滅菌済みピペットを用いて培養液を分注し、別途ご用意頂いた市販の DNA 抽出試薬の取扱説明書に従って DNA 抽出を行い、抽出液を鋳型 DNA としてください。

注1: 培養液の残りは、試験実施後の確認試験に使用する可能性があるため、試験終了後まで滅菌せず安全に注意して保存してください。

注2: DNA 抽出試薬はキットに含まれていないため、別途ご準備ください。

注3: 増菌培養にフレーザー培地をご使用の場合は、培地成分の影響により PCR が阻害される可能性がありますので、DNA 抽出液を滅菌蒸留水等で 10 倍に希釈して鋳型 DNA としてください。

【試験操作】

1) PCR (GeneLine リステリア・モノサイトゲネス 増幅試薬を使用します。)

① 凍結している PCR マスターミックスを氷上、冷蔵庫中等で穏やかに解凍してください。

② 0.2mL 用 PCR チューブに PCR マスターミックスを分注し、【鋳型 DNA の調製】4)DNA 抽出操作で調製した鋳型 DNA を加えてください。

〈PCR 反応液 (1 反応分)〉

PCR マスターミックス:	18μL
鋳型 DNA:	2μL
合計:	20μL

③ サーマルサイクラーを用いて、下記の設定にて DNA を増幅してください。

94℃、2分 ➡ 98℃、10秒 / 58℃、10秒 / 74℃、20秒 ×30サイクル ➡ 94℃、5分 ➡ 4℃静置

注1: PCR マスターミックスの凍結融解の繰り返しは避けてください。解凍後の PCR マスターミックスは冷蔵にて保存してください。

注2: 解凍した PCR マスターミックスは氷上で取り扱ってください。また、混合した PCR 反応液は反応直前まで氷上に置いてください。

注3: 鋳型 DNA の代わりに滅菌蒸留水を加えた PCR 反応液にコロニーを懸濁することでコロニーダイレクト PCR を行うことができます。コロニーの懸濁には、滅菌したピペットチップ等を使用し、多量の菌体を持ち込まないようご注意ください。(菌体を多量に持ち込んだ場合、PCR 反応を阻害する恐れがあります。)

2) 核酸クロマトグラフィーによる検出 (GeneLine リステリア・モノサイトゲネス テストストリップを使用します。)

① 展開用バッファー、テストストリップを室温に戻してください。

② PCR 後のチューブをサーマルサイクラーより取り出し、展開用バッファーを 50μL ずつ添加してよく攪拌してください。

③ テストストリップをチューブに挿入し、チューブ内に立てたまま静置してください。

④ 15 分後に目視で判定してください。

注1: テストストリップは吸湿の影響により、正しい結果が得られないことがあるため、室温に戻してからアルミ包装から取り出してください。また、使用しないテストストリップは乾燥剤とともにビニールパウチ袋に入れ冷蔵保存し、できる限り早くご使用ください。

注2: テストストリップの試料滴下部および展開部には、直接手などで触れたり、キズをつけないよう注意してください。テストストリップを持つ場合には、吸収パッドを持つようにしてください。

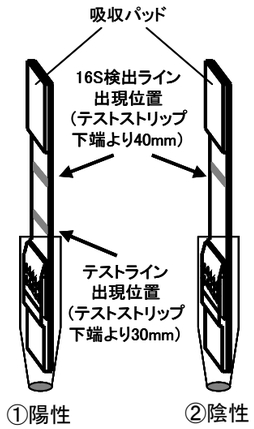
注3: テストストリップの下端がチューブの壁にあたるように静置してください。

3) 結果の判定

① 試験開始 15 分後にテストライン出現位置および 16S 検出ライン出現位置に青黒色のラインが観察される場合には、陽性と判定してください。

② テストライン出現位置に青黒色のラインが認められず、16S 検出ライン出現位置にのみ青黒色のラインが観察される場合には、陰性と判定してください。

③ 16S 検出ライン出現位置に青黒色のラインが認められない場合には、テストライン出現位置における青黒色のラインの有無に関わらず再試験としてください。培養液中の細菌数が非常に少ない可能性、もしくは DNA 増幅(PCR)や試料溶液の展開に異常があった可能性があります。



注1: 本キットで陽性と判定された試料については、公定検査法などその他の方法にて必ず確認試験を実施してください。なお、本キットの試験に用いた増菌培養済み試料を公定検査法などの確認試験に使用することが可能です。

注2: 16S 検出ラインは培養液中の細菌の存在を確認するためのラインであり、細菌数の少ない検体では着色が見られないことがあります。

【性能】

1) 検出限界

① 増幅試薬

Listeria monocytogenes ATCC19115 より抽出したゲノム DNA を用いて、本取扱説明書に記載された「試験操作」に従い試験を行うとき、ゲノム DNA 濃度が 50pg/μL 以上のとき、検出対象の遺伝子が増幅します。(*Listeria monocytogenes* のゲノム DNA50pg はおよそ 1.5×10^5CFU に相当します。)

② テストストリップ

Listeria monocytogenes ATCC19115 に由来する増幅 DNA の濃度が 25pg/μL 以上のとき、陽性を示します。

注1: 本キットの検出限界は、リステリア・モノサイトゲネスの菌株により異なります。

注2: ご使用になる DNA 抽出試薬によって検出感度が異なることがあります。

注3: 抽出後の DNA が極めて多い場合には、増幅反応が阻害されテストライン・16S 検出ラインとも検出されない可能性があります。

2) 交差反応性

① 以下の菌株に由来する DNA 抽出液を用いた交差試験において、交差反応性は認められませんでした。

菌種	菌株	15 分判定
Listeria monocytogenes	ATCC 7644, ATCC 13932, ATCC 15313, ATCC 19111, ATCC 19112, ATCC 19114, ATCC 19115, ATCC 19118, ATCC BAA-751, NCTC 10890	+
Listeria welshimeri	ATCC 35897	－
Listeria grayi	ATCC 25401, ATCC 700545	－
Listeria innocua	ATCC 33090, NCTC 11288	－
Listeria ivanovii	ATCC 19119, ATCC BAA-139	－